

COMUNICADO
TÉCNICO

146

Brasília, DF
Agosto, 2020

Embrapa

Diagnóstico de tuberculose bovina

Avanços na identificação de
Mycobacterium bovis por
espectrometria de massas MALDI-TOF

Gisele Maria Bacanelli
Larissa Costa Olarte
Gisele Oliva Leguizamon
Márcio Roberto Silva
Rudielle Arruda Rodrigues
Taynara Nunes Pasquatti
Paulo Alex Carneiro
Rodrigo Nestor Etges
Flávio Ribeiro de Araújo
Newton Valério Verbísch

Diagnóstico de tuberculose bovina

Avanços na identificação de *Mycobacterium bovis* por espectrometria de massas MALDI-TOF¹

¹ Gisele Maria Bacanelli, Bióloga, doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró Centro-Oeste (UFMS), Campo Grande, MS. Larissa Costa Olarte, Bióloga, mestranda em Bioquímica e Biologia Molecular do Programa Multicêntrico da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS. Gisele Oliva Leguizamón, Bióloga, técnica de laboratório da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. Márcio Roberto Silva, Médico-Veterinário, doutor em Saúde Pública, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Rudielle Arruda Rodrigues, Médica-Veterinária, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (UFMS), Campo Grande, MS. Taynara Nunes Pasquatti, Médica-Veterinária, doutoranda no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (UCDB) Campo Grande, MS. Paulo Alex Carneiro, Médico-Veterinário, doutorando no Center for Comparative Epidemiology, Michigan State University, Estados Unidos. Rodrigo Nestor Etges, Médico-Veterinário, Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação, Porto Alegre, RS. Flávio Ribeiro de Araújo, Médico-Veterinário, Ph.D. em Imunologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. Newton Valério Verbick, Biomédico, doutor em Ciências, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Resumo

A espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF vem sendo utilizada para a identificação de micobactérias, tanto de espécies ambientais quanto de espécies causadoras de tuberculose. Neste estudo utilizou-se MALDI-TOF para a identificação de espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, com foco em *Mycobacterium bovis*, o patógeno causador de tuberculose em bovinos. Foi desenvolvido um novo protocolo para extração de proteínas de micobactérias para MALDI-TOF, através do qual foi possível a aquisição de espectros de massas mais informativos e confiáveis, quando comparado com os obtidos pelo método de maior consenso descrito na literatura até o momento. Além disso, a adoção de espectros de massas referência para *M. tuberculosis* e *M.*

bovis próprios, gerados neste trabalho, permitiu alcançar escores de identificação confiável também para *M. bovis*, após análise de isolados bacterianos, obtidos após cultivo em meio sólido, provenientes de amostras de tecidos de bovinos e bubalinos, do Norte e Sul do Brasil. O aperfeiçoamento do método de extração de proteínas e o incremento da biblioteca de espectros aqui relatados possibilitaram identificar de modo correto e confiável 75 (86,2%) dos 87 isolados clínicos de micobactérias previamente identificados por amplificação gênica específica (RD4). Dos 87 isolados analisados, 72 foram identificados como *M. bovis*, dois como *Gordonia sputi*, um como *M. nonchromogenicum* e 11 não foram identificados (12,64%). Apenas um isolado foi erroneamente identificado como *M. tuberculosis* no MALDI-TOF. Embora a sensibilidade

para identificação de *M. bovis* por perfis protéicos seja menor que a obtida com amplificação gênica, a metodologia MALDI-TOF tem menor custo, pois requer menos reagentes e materiais, com a vantagem adicional de fornecer os resultados de modo mais rápido. Por outro lado, a identificação concomitante de bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* e a outros relacionados, eventualmente isolados na etapa de cultivo, representa uma relevante vantagem desta técnica sobre as demais em termos de especificidade, pois atualmente a biblioteca de espectros de massas registra cerca de 2750 espécies bacterianas. Conclui-se que MALDI-TOF pode ser utilizado para a identificação de espécies de *Mycobacterium*, particularmente *M. bovis*, podendo vir a ser implementada como uma importante ferramenta para diagnóstico de tuberculose bovina. Parte dos resultados aqui relatados já foram publicados (BACANELLI et al., 2019).

Palavras-chave: Tuberculose bovina, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight (MALDI-TOF), Espectrometria de Massas, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*.

Introdução

Mycobacterium bovis é uma bactéria baciliforme, aeróbica, de crescimento lento e causadora de tuberculose em bovinos e bubalinos (OIE, 2012; MICHEL et al., 2010; PADYA et al., 2015).

A tuberculose bovina (TB) acarreta perdas econômicas consideráveis que decorrem da diminuição da produtividade animal e restrições ao comércio internacional (MICHEL et al., 2010). A TB representa uma séria ameaça à saúde pública, uma vez que o consumo de alimentos contaminados, principalmente produtos lácteos não pasteurizados, permitem que a infecção seja transmitida ao homem (BEN KAHLA et al., 2011).

O controle da TB é realizado por meio do abate compulsório dos animais infectados, diagnosticados nos testes intradérmicos com derivado de proteína purificada - PPD (OIE, 2012).

O diagnóstico definitivo da TB está fundamentado no isolamento do agente etiológico por cultura microbiológica, considerada a técnica padrão-ouro (BARBIER et al., 2017). Entretanto, após o isolamento, há necessidade de confirmação etiológica (RAMOS et al., 2015), para a qual os métodos bioquímicos são considerados específicos (MICHEL et al., 2010; DUNNE et al., 2014). Todavia, o crescimento de *M. bovis* é geralmente escasso e estes testes requerem uma quantidade razoável de colônias frescas, tornando a identificação lenta, subjetiva e incapaz de classificar espécies menos comuns (SALEEB et al., 2011).

Além dos métodos bioquímicos para confirmação da identidade de micobactérias em cultivo microbiológico, as provas moleculares, como as de reação da polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (SALES et al., 2014), a de PCR seguida de análise de

restrição enzimática (*Restriction Enzyme Analysis* – PCR/PRA) (TELENTI et al., 1993) e o sequenciamento de genes conservados, tais como hsp65 e 16S rDNA (PADYA et al., 2015), têm sido utilizadas na identificação de micobactérias isoladas a partir de cultura ou amostras clínicas. Esses métodos exigem equipamentos e conhecimentos específicos, tornando o diagnóstico oneroso e demorado (SALEEB et al., 2011; ASMAR et al., 2015; MURUGAIYAN et al., 2018).

Nos últimos anos, a identificação de microrganismos baseada na espectrometria de massas por meio de ionização por dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-Flight* – MALDI-TOF), tem sido integrada ao fluxo de trabalho de diagnóstico de rotina em laboratórios de microbiologia devido à sua rapidez, confiabilidade, custo-efetividade e alto rendimento, apresentando, assim, vantagens sobre os métodos moleculares (O'CONNOR et al., 2016; MURUGAIYAN et al., 2018).

Devido às vantagens da técnica, o uso de MALDI-TOF na identificação de diferentes microrganismos cresceu exponencialmente na última década (WATTAL et al., 2017), tendo inclusive apresentado eficiência na identificação de micobactérias ambientais (EL KHÉCHINE et al., 2011; SALEEB et al., 2011; BALÁZOVÁ et al., 2014; MURUGAIYAN et al., 2018) e patogênicas, tais como as causadoras de tuberculose (SHITIKOV et al., 2011).

Embora a técnica classifique com precisão isolados em nível de gênero e complexo *M. tuberculosis* (CMT), que incluem as variantes *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis*, ainda não foi descrita a diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* através de MALDI-TOF (LOTZ et al., 2010; SALEEB et al., 2011; MACHEN et al., 2013; QUINLAN, et al., 2015).

Assim, o objetivo traçado neste estudo foi desenvolver um método para a identificação de *M. bovis* por meio da técnica MALDI-TOF, de modo a permitir a análise de isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de tecidos cultivadas em meio sólido. Para isso foi utilizada a plataforma de espectrometria de massas da Bruker Daltonics, composta por espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF e programa computacional Biotyper, disponíveis na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e na Embrapa Gado de Corte. A metodologia envolve a aquisição de espectros de massas de proteínas extraídas dos isolados bacterianos e sua comparação com espectros de massas homólogos de isolados de referência depositados em banco de dados. Desse modo é possível a identificação confiável de gênero e espécies de isolados bacterianos, baseado no resultado de maior similitude com os espectros de uma biblioteca de referência, que inclui atualmente mais de 2750 espécies bacterianas catalogadas, entre as quais 164 das cerca de 180 espécies de micobactérias conhecidas até o momento.

Estabelecimento da metodologia MALDI-TOF Biotyper para identificação de espécies de *Mycobacterium*

A parede celular das micobactérias é rica em lipídios e contém peptidoglicanos esterificados com ácidos micólicos, o que dificulta a obtenção de proteínas para análise por espectrometria de massas (BALÁZÖVA et al., 2014). Após consulta à literatura científica recente, verificou-se que já foram descritos diversos protocolos diferentes para otimizar a etapa de extração de proteínas e possibilitar a identificação e classificação de micobactérias após cultivo, seja a partir de meios líquidos ou sólidos (EL KHÉCHINE et al., 2011; O'CONNOR et al., 2016; MURUGAIYAN et al., 2018). Entretanto, é consenso que os protocolos de ruptura celular com esferas de sílica/zircônio são dos mais eficientes para extração proteica e fornecem os melhores resultados para a identificação de micobactérias (SALEEB et al., 2011). Porém, nenhum deles demonstrou até o momento a identificação inequívoca de *M. bovis* frente às demais espécies do CMT.

A Bruker Daltonics, fabricante dos equipamentos MALDI-TOF e pioneira na identificação de microrganismos por MALDI-TOF, recomenda o protocolo denominado MycoEx (O'CONNOR et

al., 2016), que envolve a agitação das células bacterianas em presença de esferas de sílica/zircônio de 0,5 mm de diâmetro. Em testes preliminares realizados no Laboratório de Proteômica e Espectrometria de Massas em Saúde Animal da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande (MS), a utilização do protocolo MycoEx para extração de proteínas, em conjunto com a utilização da biblioteca de referências do programa computacional Biotyper (BDAL + Myco v.5.0, com 8224 espectros de referência – MSPs), não possibilitou a classificação dos isolados de cultivo em meio sólido, provenientes de tecidos de animais com tuberculose, obtidos no Laboratório de Imunologia Animal da Embrapa Gado de Corte (OLARTE et al., 2016). Diante disso, decidiu-se pela introdução e testagem de modificações no método de extração de proteínas, e os resultados estão apresentados a seguir.

Utilizando como padrão a cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis*, cedida pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), Campo Grande (MS), foram comparados dois protocolos de extração proteica: o protocolo MycoEx, relatado por O'CONNOR e cols. (2016), e o protocolo MycoLyser, desenvolvido neste estudo e assim denominado em razão da utilização do aparelho MagNA Lyser (Roche Molecular Systems) para otimizar a etapa de ruptura celular. O MagNA Lyser é um homogeneizador que simultaneamente rompe e homogeneiza o tecido/célula pela rápida agitação deste em presença de esferas de composições materiais e tamanhos definidos (KIRCHGESSER

et al., 2006; PEETERS et al., 2016, RODRIGUES et al., 2017).

Para este estudo comparativo, as células foram coletadas e inativadas do mesmo modo nos dois protocolos. Resumidamente, realizou-se a coleta de duas alçadas de bactérias, que foram homogeneizadas por vórtex em 200 μL de água ultrapura estéril e, em seguida, inativadas por incubação em termobloco a 95°C durante 45 minutos – procedimentos estes realizados em ambiente de biossegurança nível 2, no Laboratório de Imunologia Animal da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande (MS). Após a etapa de inativação por calor as células foram resfriadas à temperatura ambiente; adicionou-se etanol absoluto, concentração final de 70% (v/v). Prosseguiu-se à etapa de extração proteica de acordo com os protocolos MycoEx e MycoLyser, descritos a seguir. Foram utilizados solventes orgânicos (Sigma-Aldrich) com grau de pureza para espectrometria de massas.

Protocolo MycoEx

As células inativadas em álcool 70% foram submetidas à centrifugação por 2 minutos a 14000 g, o sobrenadante descartado e os tubos com os sedimentos foram mantidos a temperatura ambiente com as tampas abertas por 3 minutos para evaporação do resíduo de álcool. Foram adicionados aos tubos 50 μL de acetonitrila e ~150 mg de esferas de sílica/zircônia de 0,5 mm de diâmetro (Biospec), seguido da imediata agitação em vórtex

por 60 segundos na velocidade máxima (3200 rpm). Após adição de 50 μL de ácido fórmico e agitação em vórtex por 10 segundos, os extratos foram novamente centrifugados por 2 minutos a 14000 g e o sobrenadante utilizado para a posterior aquisição dos espectros de massas.

Protocolo MycoLyser

Foram adicionadas 300 mg de esferas de sílica/zircônia de 0,5 mm de diâmetro (Biospec) à suspensão etanólica de células inativadas por calor, conforme descrito acima. A homogeneização foi realizada em aparelho MagNA Lyser (Roche Molecular Systems) por três ciclos consecutivos de 30 segundos a 5.000 rpm. O homogeneizado celular foi transferido para tubo novo estéril, desprezando-se as esferas, e após centrifugação por 2 minutos a 14.000 g o sobrenadante foi descartado. O tubo contendo o sedimento foi mantido a temperatura ambiente com a tampa aberta por 3 minutos para evaporação do resíduo de álcool. Foram adicionados 10 μL de ácido fórmico e igual volume de acetonitrila, com agitação em vórtex por 15 segundos, seguido da centrifugação do extrato protéico por 2 minutos a 14.000 g, sendo o sobrenadante utilizado para a aquisição dos espectros de massas na etapa posterior.

Análise por MALDI-TOF Biotyper

Para análise por espectrometria de massas MALDI-TOF, os extratos

protéicos obtidos com os dois protocolos seguiram o mesmo procedimento. Aplicou-se 1 μ L do sobrenadante protéico em poço da placa para MALDI-TOF (Bruker Daltonics), deixando-o secar a temperatura ambiente. Foi adicionado 1 μ L de ácido α -ciano-4-hidróxicinâmico (5mg/mL) em solução contendo 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoracético (v/v), seguido da secagem dos solventes a temperatura ambiente. A mistura cristalizada foi analisada em espectrômetro de massas Autoflex (Bruker Daltonics), utilizando-se calibração externa com o calibrante de massas para bactérias BTS (Bruker Daltonics). Os espectros obtidos foram processados empregando-se o programa computacional Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics). Para a identificação de espécie, os perfis protéicos contendo as informações de massa e intensidade foram comparados diretamente com os da biblioteca de referências, composta de 7.311 perfis de diferentes gêneros e espécies de bactérias (BDAL) e 912 perfis de espécies de micobactérias (Myco v.5.0) (Bruker Daltonics), sendo ambas as mais completas bibliotecas disponíveis atualmente. É importante ressaltar que o programa Biotyper compara os valores de massa e respectivas intensidades, observados nos espectros de massas experimentais, com os dos espectros de massas referência depositados na biblioteca, fornecendo o resultado de maior similaridade possível encontrado na biblioteca. Assim, o perfil de um determinado espectro de massas experimental ou espectro médio (MSP), quando analisado no Biotyper, resulta

na identificação dos perfis de referência mais semelhantes, listados de acordo com um escore calculado pelo algoritmo do Biotyper, cujo valor máximo é três (3,000). Desse modo, quanto mais representativa e fiel a biblioteca de referência, mais acurada será a identificação das espécies bacterianas em questão.

Identificação de *M. tuberculosis* por MALDI-TOF Biotyper após extração proteica com os protocolos MycoEx e MycoLyser

Ainda com o propósito de avaliar a eficiência do método para identificação de *Mycobacterium* em nível de espécie, comparámos os protocolos MycoEx e MycoLyser de extração proteica, utilizando a amostra de referência de *M. tuberculosis* como padrão. Observou-se que os maiores escores de identificação com o programa computacional Biotyper foram obtidos quando utilizado o protocolo MycoLyser (Figura 1). As medianas dos escores de 18 espectros obtidos experimentalmente foi de 1,656 para MycoEx e de 1,862 para MycoLyser, sendo significativamente maior com o protocolo MycoLyser ($p < 0.0001$). Além disso, os escores obtidos com MycoLyser foram majoritariamente superiores ao valor limite de 1,800, proposto pela Bruker Daltonics como valor mínimo para identificação de micobactérias com alta confiabilidade.

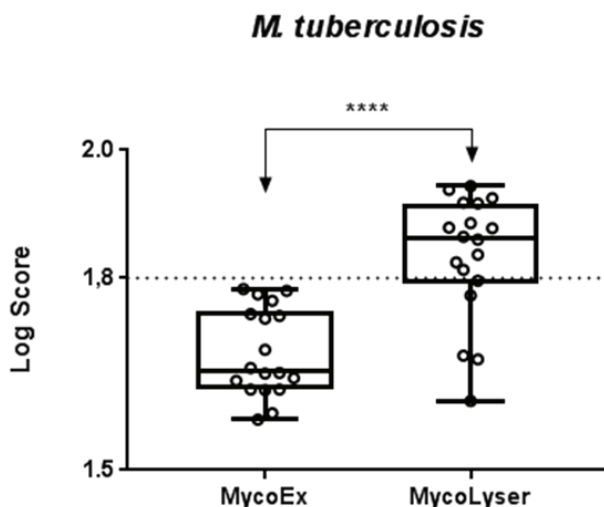


Figura 1. Escores de identificação de *M. tuberculosis*, após extração proteica com os protocolos MycoEx e MycoLyser e análise por MALDI-TOF Biotyper. Box-plot e intervalo de confiança 95% do logaritmo dos escores dos espectros de massas (18 réplicas) após comparação com as bibliotecas de referência BDAL e Myco v.5.0. A linha pontilhada indica o valor de escore limiar, proposto pela Bruker Daltonics, acima do qual a confiabilidade de identificação de micobactérias é alta. **** corresponde a diferença significativa com $p < 0.0001$ (valor exato, two-tailed) após teste Mann-Whitney.

Verificou-se também que o uso do protocolo MycoLyser proporcionou melhores resultados quanto à acurácia e confiabilidade da identificação, uma vez que os espectros de massas obtidos a partir desse protocolo foram mais frequentemente identificados de forma correta como *M. tuberculosis*, conforme seria esperado (Figura 2 e Tabela 1).

Os espectros médios (MSPs) gerados com as 18 réplicas obtidas com MycoEx e MycoLyser foram confrontados com a biblioteca de referências (BDAL + Myco v.5.0), contendo 8.223 espectros de referência distintos, estando inclusas 912 referências de micobactérias, dentre as quais as espécies de CMT. Nessa análise, observou-se

que o MSP após MycoEx teve como maior escore de identificação (1,656) a espécie *Mycobacterium bovis* (referência Bovinus An_1 PGM), enquanto que o MSP após MycoLyser apresentou o maior escore de identificação (1,798) com *Mycobacterium tuberculosis*_complex (referência *M. tuberculosis* 03L LDW b) (Figura 2).

A extração de proteínas com o protocolo MycoLyser também possibilitou maior detecção de peptídeos e proteínas com valores de massa acima de 6.000 Daltons (Figura 2), o que indica que essa faixa de massa pode ser importante para a distinção das espécies de CMT e identificação correta das micobactérias em nível de espécie.

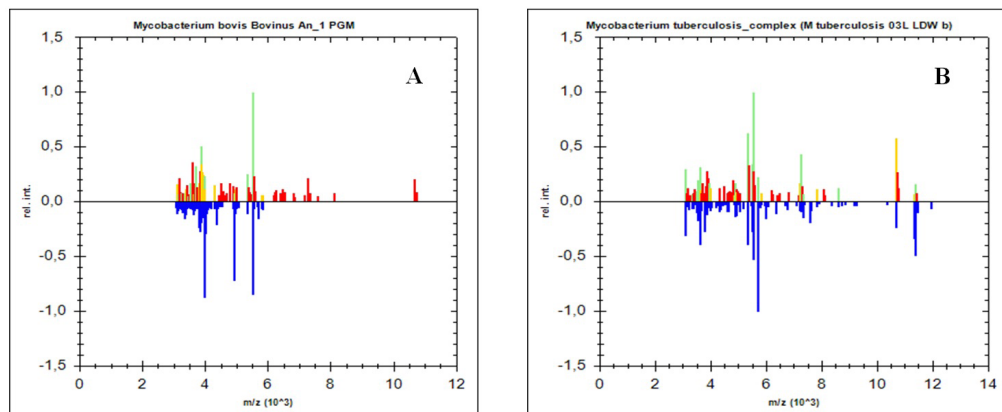


Figura 2. Perfis de identidade de *M. tuberculosis*, após extração proteica com os protocolos MycoEx (A) e MycoLyser (B) e análise por MALDI-TOF Biotyper. Espectro de massas de referência (colorido, superior) mais semelhante aos espectros médios (MSPs) (azul, inferior) gerados com as 18 réplicas obtidas de acordo com os protocolos MycoEx (A) e MycoLyser (B), após comparação com 8223 espectros de referência distintos.

De acordo com a Bruker Daltonics, a confiabilidade (alta, média e baixa) da identificação pode ser avaliada pela consistência dos três escores mais altos quanto à identificação para o mesmo gênero e/ou espécie. Os três níveis de confiabilidade são definidos pelos seguintes critérios:

Consistência de espécie; a confiabilidade de identificação para espécie é alta – considera-se que os três escores mais altos devem apresentar o mesmo resultado de identificação de gênero e espécie;

Consistência de gênero; a confiabilidade de identificação para gênero é alta – considera-se que os três escores mais altos apresentam o mesmo resultado de identificação de gênero;

Ausência de consistência; não há confiabilidade de identificação de gênero

ou espécie – os critérios consistência de espécie e de gênero acima descritos não são atendidos.

Os resultados de identificação do Biotyper com os três mais altos escores obtidos para cada um dos 18 espectros MycoEx e MycoLyser foram assim avaliados quanto à confiabilidade de identificação. Pôde-se constatar que consistência de espécie foi observada apenas para os espectros obtidos com o protocolo MycoLyser (38,8%), enquanto que os espectros obtidos com o protocolo MycoEx majoritariamente (83,3%) não apresentaram consistência na identificação de espécie e de gênero. A ausência de consistência foi bastante menor com o protocolo MycoLyser (16,7%) (Tabela 1).

Tabela 1. Confiabilidade de identificação de *M. tuberculosis* após extração proteica com os protocolos MycoEx e MycoLyser e análise por MALDI-TOF Biotyper.

Protocolo	Consistência Espécie(%)	Consistência Gênero(%)	Ausência de Consistência(%)
MycoEx	0	16,7	83,3
MycoLyser	38,8	44,5	16,7

A consistência foi avaliada considerando-se os três resultados de identificação de maior escore para cada um dos 18 espectros obtidos com os dois protocolos.

Outra observação importante é a de que, dos 18 espectros MycoEx, apenas 08 (44,44%) apresentaram, conforme esperado, identificação para *M. tuberculosis* no escore mais alto, enquanto que com MycoLyser isso foi observado para 14 espectros (77,77%), sugerindo maior especificidade do protocolo MycoLyser.

O protocolo MycoLyser para extração de proteínas de micobactérias mostrou-se superior ao protocolo MycoEx, permitindo a obtenção de resultados de identificação em nível de espécie para *M. tuberculosis*. Na seção seguinte são apresentados os resultados de identificação de *M. bovis* utilizando-se esse protocolo para extração de proteínas.

Identificação de *M. bovis* por MALDI-TOF Biotyper

Foram utilizadas 87 amostras de tecidos, provenientes de 35 bovinos e 21 bubalinos, naturalmente infectados, com ou sem lesões sugestivas de tuberculose, de duas regiões do Brasil:

Norte: coletadas em abatedouros-frigoríficos nos Estados do Amazonas (31) e Pará (2);

Sul: coletadas durante a necropsia, em abatedouros-frigoríficos, de animais abatidos para realização de vazio sanitário de três rebanhos leiteiros dos municípios de Arroio do Meio e Bom Retiro do Sul, Rio Grande do Sul (54).

As amostras acondicionadas em sacos plásticos vedados e devidamente identificados, foram congeladas e enviadas sob refrigeração em caixa isolante térmica para o Laboratório de Imunologia Animal da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande (MS). Para o isolamento em cultivo, as amostras de tecidos forma preparadas conforme Rodrigues e cols. (2017). As 87 amostras de tecido de bovinos e bubalinos foram cultivadas em meio sólido Stonebrink e todas apresentaram crescimento bacteriano. Estes isolados foram previamente identificados por métodos moleculares baseados em PCR convencional para a região que flanqueia a região de diferenciação RD4 conforme Sales e cols. (2014), presente em *M. bovis* e ausente nos demais membros do CMT

(BROSCH et al., 2002). Além disso, para os isolados negativos para RD4 na PCR, foi realizado sequenciamento parcial do gene *hsp65* (TELENTI et al., 1993., PADYA et al., 2015). Os isolados de campo foram analisados por MALDI-TOF Biotyper utilizando-se apenas o protocolo MycoLyser de extração proteica. À biblioteca de referências (BDAL + Myco v.5.0), foi incluído o MSP de referência de *M. tuberculosis* obtido com o protocolo MycoLyser, gerado na avaliação descrita anteriormente. Também foi incluído um MSP de referência para *M. bovis*, gerado a partir dos espectros de quatro isolados de campo (três bovinos e um bubalino) escolhidos aleatoriamente entre todos os isolados.

Os 87 isolados de campo foram identificados pelas três metodologias (PCR RD4, Sequenciamento do gene *hsp65* e MALDI-TOF Biotyper) e os resultados estão sumarizados na Tabela 2. Dos 87 isolados analisados, apenas 5 não foram identificados como *M. bovis* após PCR RD4. Desses 5 isolados negativos no PCR RD4, 3 foram identificados após sequenciamento e somente 2 não foram identificados por quaisquer das metodologias testadas. Por MALDI-TOF Biotyper foi possível identificar de modo correto e confiável 75 (86,2%) dos isolados clínicos de micobactérias, previamente identificados por amplificação gênica específica e sequenciamento do gene *hsp65*. 72 isolados foram identificados como *M. bovis*, com escores variando entre 1,880 e 2,750, 2 como *Gordonia sputi* e 1 isolado como *Mycobacterium nonchromogenicum*. Por outro lado, 11

isolados (12,64%) não tiveram espectros de massas com escore que permitisse identificação confiável e não puderam ser identificados. Considerando que 9 desses 11 isolados foram confirmados como *M. bovis* por PCR RD4, podemos estimar a sensibilidade para identificação de *M. bovis* pela técnica MALDI-TOF Biotyper aqui utilizada como sendo de 87,35%. Considerando-se que apenas 1 isolado, positivo no PCR RD4, foi identificado erroneamente como *M. tuberculosis*, pode-se considerar 98,8% de especificidade na identificação de *M. bovis* por MALDI-TOF Biotyper.

Tabela 2. Identificação dos isolados de tecidos de bovinos e bubalinos com tuberculose por PCR (RD4), Sequenciamento (*hsp65*) e MALDI-TOF Biotyper.

Isolado	PCR (RD4)	Sequenciamento (<i>hsp65</i>)	MALDI-TOF Biotyper
1	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
2	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
3	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
4	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
5	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
6	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
7	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
8	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
9	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
10	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
11	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
12	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
13	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
14	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
15	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
16	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
17	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
18	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
19	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
20	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. tuberculosis</i>
21	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
22	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
23	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
24	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
25	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
26	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
27	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
28	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
29	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
30	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
31	Negativo	Negativo	Não identificado

32	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
33	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
34	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
35	Negativo	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
36	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
37	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
38	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
39	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
40	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
41	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
42	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
43	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
44	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
45	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
46	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
47	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
48	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
49	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
50	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
51	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
52	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
53	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
54	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
55	<i>M. bovis</i>	NR	Não Identificado
56	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
57	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
58	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
59	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
60	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
61	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
62	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
63	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
64	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
65	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>

66	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
67	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
68	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
69	Negativo	<i>Gordonia</i> sp.	<i>Gordonia sputi</i>
70	Negativo	<i>Gordonia</i> sp.	<i>Gordonia sputi</i>
71	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
72	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
73	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
74	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
75	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
76	Negativo	Negativo	Não identificado
77	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
78	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
79	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
80	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
81	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
82	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
83	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
84	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
85	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
86	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>
87	<i>M. bovis</i>	NR	<i>M. bovis</i>

NR: Não realizado.

Com o propósito de ilustrar a importância de incluir espectros de referências adequados na biblioteca de referências para identificação por MALDI-TOF Biotyper, avaliaram-se os escores de identificação de *M. bovis* com e sem a presença na biblioteca de um MSP de *M. bovis* próprio, gerado a partir dos

espectros de quatro dos isolados de campo obtidos neste trabalho. Para essa análise foram utilizados os 72 isolados que tiveram a identificação confiável no MALDI-TOF Biotyper (Figura 3).

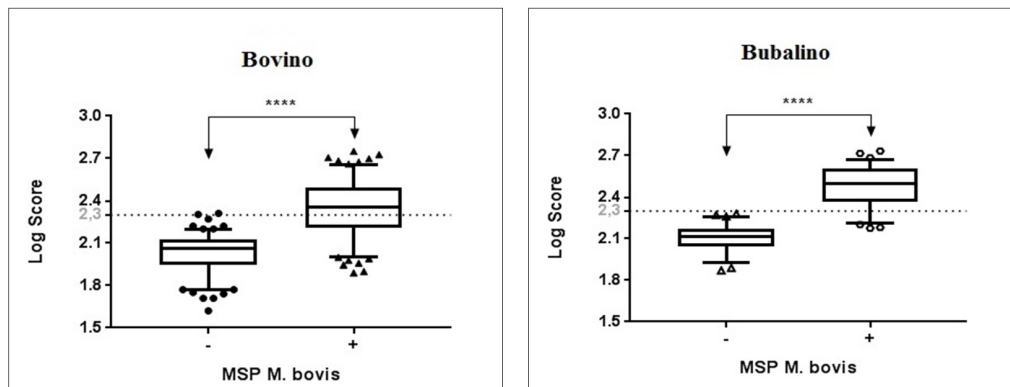


Figura 3. Escores de identificação de isolados de bovinos e bubalinos, com extração proteica por MycoLyser e MALDI-TOF Biotyper. Box-plot e intervalo de confiança 95% do logaritmo dos escores dos espectros de massas de isolados de campo de bovinos (n=50; esquerda) e bubalinos (n=22, direita) após confronto com as bibliotecas de referências BDAL + Myco v.5.0 + *M. tuberculosis* MycoLyser (8224 espectros referência distintos), na ausência ou presença de MSP de *M. bovis*, obtido a partir de quatro isolados de campo deste trabalho. A linha pontilhada indica o valor de escore limiar, proposto pela Bruker Daltonics, acima do qual a confiabilidade de identificação de espécie de bactérias em geral é alta. **** corresponde a diferença significativa com $p < 0.0001$ (valor exato, two-tailed) após teste Wilcoxon.

De modo geral, os escores de identificação dos isolados de campo de bovinos e bubalinos apresentaram valores acima do limiar de 1,800. Entretanto, os escores de identificação foram significativamente superiores após introdução à biblioteca de referências do MSP para *M. bovis*. A inclusão do MSP de *M. bovis* na análise resultou em escores de identificação com medianas superiores, inclusive, ao limiar de 2,300 proposto pela Bruker Daltonics, acima do qual a confiabilidade de identificação de espécie de bactérias em geral é alta. Esse resultado demonstra que a metodologia aqui proposta para identificação de micobactérias permite utilizar o mesmo limiar de confiabilidade da técnica MALDI-TOF Biotyper habitualmente, aceito para a identificação da

grande maioria das bactérias, conforme descrito na literatura. É importante frisar que estes resultados não foram alterados quando os 72 isolados de campo foram classificados de acordo com o genótipo (BACANELLI et al., 2019).

Discussão

A identificação de micobactérias é realizada habitualmente por métodos microbiológicos e confirmada por métodos bioquímicos (SHITIKOV et al., 2011) e/ou moleculares (REDDINGTON et al., 2011; BARBIER et al., 2017). Os métodos bioquímicos para confirmação de *M. bovis* necessitam de quantidade considerável de cultura fresca. Além disso, o crescimento de *M. bovis* é lento

e normalmente produz poucas colônias, o que demanda novo cultivo destas para se conseguir material suficiente para os testes bioquímicos, tornando a metodologia bastante demorada (MEDEIROS et al., 2010). Já os métodos moleculares baseados em PCR permitem uma rápida confirmação de colônias de *M. bovis*, contudo, quando há crescimento no meio de cultura de outras espécies do CMT ou micobactérias ambientais, é necessária a utilização de iniciadores específicos para cada espécie, ou técnicas complementares, como o sequenciamento de DNA.

Padya e cols. (2015) utilizaram a amplificação e o sequenciamento do gene 16S rDNA para identificar espécies de *Mycobacterium* de importância para a saúde pública em bovinos no Zimbábue. Embora tenham utilizado iniciadores específicos para o gênero *Mycobacterium* sp. também amplificaram o gene 16S rDNA de espécies de *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Tsukamurella* e *Gordonia*, demonstrando que a técnica PCR isolada, baseada apenas no gene 16S rDNA não seria suficiente para diferenciar os microrganismos encontrados no estudo. Esta necessidade de passos adicionais eleva o tempo e os custos para a correta identificação de espécies de micobactérias, além do que muitas vezes estes métodos são restritos a laboratórios de referência (QUINLAN et al., 2015).

A metodologia MALDI-TOF tem possibilitado a identificação de uma grande variedade de espécies bacterianas, entre as quais micobactérias, com tempo e

custo reduzidos (DE CAROLIS et al., 2014; PIGNONE et al., 2006; LOTZ et al., 2010; SALEEB et al., 2011; CHEN et al., 2013; BALADA-LLASAT et al., 2013; MATHER et al., 2014; RICCHI et al., 2016; SAMLI; ILKI, 2016; RAVVA et al., 2017). Contudo, o uso de MALDI-TOF para identificação de micobactérias ainda é menos satisfatório do que para outras bactérias, em virtude dos requisitos de preparação de amostra (O'CONNOR et al., 2016).

Neste comunicado técnico, relata-se a identificação de *M. bovis* por espectrometria de massas MALDI-TOF em amostras de tecidos de bovinos e bubalinos naturalmente infectados, isolados em meio sólido, previamente identificadas por PCR convencional com base na região que flanqueia RD4. Foram introduzidas modificações metodológicas importantes com o protocolo MycoLyser, que possibilitaram melhoria na ruptura celular e liberação de proteínas micobacterianas. Similarmente, O'Connor e cols. (2016), usando um método de sonicação demonstrou melhoria na identificação de isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e de micobactérias não tuberculosas, diminuição das falhas para obter a correta identificação do gênero em todos os isolados testados e aumento de 50% no número de isolados com escore ≥ 2 . Saleeb e cols. (2011) também utilizaram um método modificado de extração proteica a fim de melhorar a qualidade dos espectros e consequentemente a correta identificação de micobactérias.

Entretanto, mesmo utilizando protocolos aperfeiçoados, aqueles autores não conseguiram diferenciar os membros do CMT através de MALDI-TOF.

Conforme aqui relatado, a diferenciação de *M. bovis* dos demais membros do CMT só foi possível após a inclusão na biblioteca Biotyper dos espectros de referência de *M. bovis* e *M. tuberculosis* obtidos com o protocolo MycoLyser. Em virtude da incompletude dos bancos de dados comerciais, tais como o da Bruker Daltonics, a adição de amostras de referência locais pode melhorar os índices de identificação e diferenciação de espécies de micobactérias (LOTZ et al., 2010; SALEEB et al., 2011; EL KHÉCHINE et al., 2011).

A identificação precisa de *M. bovis* é importante tanto para o diagnóstico de tuberculose em bovinos quanto para estudos epidemiológicos de saúde pública, a fim de otimizar o tratamento dos pacientes (SILVA et al., 2013; CARVALHO et al., 2016), haja vista que a tuberculose humana pode ser causada por *M. bovis*, e este patógeno ser resistente ao antibiótico pirazinamida, de primeira escolha no tratamento da tuberculose em humanos (GOH; RASTOGI, 2010).

Ainda que a PCR tenha identificado com *M. bovis* um número maior de isolados quando comparado ao MALDI-TOF, este último permitiu a diferenciação de forma precisa de membros do CMT e de outras micobactérias não causadoras de tuberculose, sem a necessidade de métodos adicionais. Além disso, os

resultados do MALDI-TOF foram obtidos em até 45 minutos, sendo quatro vezes mais rápido do que os de PCR para RD4. Considerando a etapa adicional de sequenciamento para hsp65 foram necessários mais três dias para se obter a identificação dos isolados negativos por PCR.

Além da rapidez e facilidade na preparação das amostras para MALDI-TOF, outra vantagem na utilização desta técnica é o fato de não exigir tantos reagentes e materiais descartáveis quanto os exigidos pelos métodos moleculares, sendo por isso uma metodologia mais econômica e mais limpa. Segundo Lotz e cols. (2010), a economia de custos com MALDI-TOF é considerável (um euro/amostra) em comparação com outros métodos moleculares, que podem ser 40 vezes mais caros. E embora os investimentos iniciais para a aquisição do equipamento para espectrometria de massas MALDI-TOF e do programa computacional Biotyper sejam relativamente elevados, estes investimentos podem ser recuperados em poucos anos, em virtude da economia gerada pelo uso desta técnica, frente aos métodos moleculares (DUSKOVÁ et al., 2012).

Os resultados indicam que MALDI-TOF Biotyper seja usado como uma ferramenta de triagem rápida e de menor custo na identificação de *M. bovis*, enquanto que a PCR seria realizada somente nos isolados que fossem negativos após a análise por MALDI-TOF.

Conclusão

O uso do protocolo MycoLyser para extração de proteínas aliado ao incremento da biblioteca de espectros de referência permite a identificação confiável de *Mycobacterium bovis* por MALDI-TOF Biotyper, podendo assim no futuro viabilizar o diagnóstico rápido, preciso e de menor custo de tuberculose bovina por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Agradecimentos

Ao valioso apoio da equipe de analistas da Bruker do Brasil, nomeadamente Wellington Conde, Diego Assis e Rafaela Franciscan.

Ao colega analista Dr. Daniel Sifuentes e demais colaboradores do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio técnico.

Ao colega pesquisador Dr. Carlos Bloch Jr, responsável pelo Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela inestimável colaboração ao disponibilizar o espaço do laboratório e equipamentos daquela unidade da Embrapa.

Referências

ASMAR, S., CHATELLIER, S., MIRANDE, C., BELKUM, A. V., CANARD, I., RAULT, D., DRANCOURT, M. et al. A novel solid medium for culturing *Mycobacterium tuberculosis* isolates from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 2566-2569, 2015.

BACANELLI, G., OLARTE, L. C., SILVA, M.R. et al. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight mass spectrometry identification of *Mycobacterium bovis* in Bovinae. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 81, p. 1400-1408, 2019.

BALADA-LLASAT, J. M., KAMBOJ, K., PANCHOLI, P. Identification of *Mycobacteria* from Solid and Liquid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology** p. 2875-2879. Sep 2013, v. 51, n. 9, 2013.

BALÁZOVÁ, T., MAKOVCOVA, J., SEDO, O., SLANY, M., FALDYNA, M. et al. The influence of culture conditions on the identification of *Mycobacterium* species by MALDI-TOF MS profiling. **FEMS Microbiology Letter**, v. 353, p. 77-84, 2014.

BARBIER, E., ROCHELET, M., GAL, L., BOSCHIROLI, M. L., HARTMANN, A. Impact of temperature and soil type on *Mycobacterium bovis* survival in the environment. **Plos One**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176315> Apr 27, 2017.

BEN KAHLA, I., BOSCHIROLI, M. L., SOUSSI, F. et al. Isolation and molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* from raw milk in Tunisia. **African Health Sciences**, v. 11 Suppl 1(Suppl 1): S2-S5, 2011.

BROSCH, R., GORDON, S.V., MARMIESSE, M., BRODIN, P., BUCHRIESER, C. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 99, n.6, p. 3684-3689, 2002.

CARVALHO, R. C.T., VASCONCELLOS, S. E. G., ISSA, M. A., FILHO, P. M. S., MOTA, et al. Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* from Cattle Reared in Midwest Brazil. **Plos One**, DOI:10.1371/journal.pone.0162459, Sep 15, 2016.

CHEN, J. H. K., YAM, W.C., NGAN, A. H. Y., FUNG, A. M. Y., WOO, W. L. et al. Advantages of Using Matrix-Assisted Laser Desorption- Ionization Time of Flight Mass Spectrometry as a Rapid Diagnostic Tool for Identification of Yeasts and *Mycobacteria* in the Clinical Microbiological Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 3981-3987, 2013.

DE CAROLIS, E., VELLA, V., VACCARO, L., TORELLI, R., SPANU, T. et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 9, p. 1081-1088,

2014.

DUNNE, W. M., DOING, J. K., MILLER, M., MILLER, E., MORENO, E. et al. Rapid Inactivation of *Mycobacterium* and *Nocardia* Species before Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3654–3659, 2014.

DUSKOVÁ, M., ŠEDO, O., KŠICOVÁ, K., ZDRÁHA, Z., KARPÍŠKOVÁ, R. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. **International Journal of Food Microbiology**, Palackého, v. 159, n. 2, p. 107–114, 2012.

EL KHÉCHINE, A., COUDERC, C., FLAUDRUPS, C., RAOULT, D., DRANCOURT, M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. **Plos One**, v.6, p.e24720, 2011.

GOH, K. S.; RASTOGI, N. “Simple and rapid method for detection of nitrate reductase activity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium canettii* grown in the Bactec MGIT960 system,” **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 208–210, 2010.

KIRCHGESSER, M., ADEM, C., BAUMGARTNER, A., GIRGNHUBER, H., MALMBERG, W. et al. Automated Isolation of DNA from Tissue Samples in 35–50 Minutes. **Biochemica**, n. 1, p 9–10, 2006.

LOTZ, A., FERRONI, A., BERETTI, J. L., DAUPHIN, B., CARBONNELLE, E. et al. Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n. 12, p. 4481–4486, 2010.

MACHEN, A., KOBAYASHI, M., CONNELLY, M. R., WANG, Y. F. W. Comparison of heat inactivation and cell disruption protocols for identification of mycobacteria from solid culture media by use of Vitek matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4226–4229, 2013.

MATHER, C.A., RIVERA, S.F., BUTLER-WU, S.M. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Mycobacteria Using Simplified Protein Extraction Protocols. **Journal of Clinical**

Microbiology, v. 52, n. 1, p. 130–138, 2014.

MEDEIROS, L.S., MARASSI, C.D., FIGUEIREDO, E. E. S., LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n. 7, p. 1–11, 2010.

MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P.D. *Mycobacterium bovis* at the animal human interface: A problem, or not? **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 371–381, 2010.

MURUGAIYAN, J. LEWIN, A., KAMAL, E., Bakula, Z., VAN INGEN, J. et al. MALDI Spectra Database for Rapid Discrimination and Subtyping of *Mycobacterium kansasii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.587, 2018.

O’CONNOR, J. A., LYNCH-HEALY, M., CORCORAN, D., O’REILLY, B., O’MAHONY, J. et al. Improved Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Identification of *Mycobacterium* spp. by Use of a Novel Two-Step Cell Disruption Preparatory Technique. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 495–496, 2016.

OIE (2012). Bovine tuberculosis. **OIE - World Organization for Animal Health**. Disponível em: <http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

OLARTE, L. C., DUARTE, L. de F. C., LEGUIZAMON, G. O. de C., ARAUJO, F. R., VERBISCK, N. V. Identification and classification of Mycobacterium by MALDI-TOF mass spectrometry. In: **1st IBERO-AMERICAN and 6th BrMASS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY, 2016, Rio de Janeiro**. Resumos. Campinas: Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, 2016. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/166582/1/Identification-and-classification-of-Mycobacterium.pdf>

PADYA, L., CHIN’OMBE, N., MAGWENZI, M., MBANGA, J., RUHANYA, V., NZIRAMASANGA, P. Molecular identification of *Mycobacterium* Specie of public heath importance in cattle in Zimbabwe by 16S rRNA gene sequencing. **The Open Microbiology Journal**, v. 9, p. 38–42, 2015.

PEETERS, M., HUANG, C. L. VONK, L. A., LU, Z. F., BANK, R. A. et al. Optimisation of high-quality total ribonucleic acid isolation from cartilaginous tissues for real-time polymerase chain reaction analysis. **Bone Joint Research**, n. 5 p. 560–568, 2016.

PIGNONE, M., GRETH, K. M., COOPER, J., EMERSON, D., TANG, J. Identification of *Mycobacteria* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2044, n. 6, p. 1963–1970, 2006.

QUINLAN, P., PHELAN, E., DOYLE, M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of mycobacteria from MBBacT ALERT 3D liquid cultures and Lowenstein-Jensen (LJ) solid cultures. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68, p. 229–235, 2015.

RAMOS D. F., SILVA P. E. A., DELLAGOSTIN O. A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n.4, p. 830–837, 2015.

RAVVA, S. R.; HARDEN, L. A.; SARREAL, C. Z. Characterization and Differentiation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from Other *Mycobacteria* Using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 297, 2017.

REDDINGTON, K., O'GRADY, J., DORAI-RAJ, S., MAHER, M., VAN SOOLINGEN, D. et al. Novel Multiplex Real-Time PCR Diagnostic Assay for Identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 651–657, 2011.

RICCHI, M., MAZZARELLI, A., PISCINI, A., DI CARO, A., CANNAS, A., et al. Exploring MALDI-TOF MS approach for a rapid identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* field isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v.122, p. 568–577, 2016.

RODRIGUES, R. A., MENESES, I.I F. S., JORGE, K. S. G., SILVA, M. R., SANTOS, L. R. et al. False-negative reactions to the comparative intradermal tuberculin test for bovine tuberculosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 37, v.12 p. 1380–1384, 2017.

SALEEB, P.G., DRAKE, S. K., MURRAY, P. R., ZELAZNY, A. M. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1790–1794, 2011.

SALES, M. L. et al. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia Microbiológica**, v. 59, n. 5, p. 433–438. 2014.

SAMLI, A. İLKI, A. Comparison of MALDI-TOF MS, nucleic acid hybridization and the MPT64 immunochromatographic test for the identification of *M. tuberculosis* and non-tuberculosis *Mycobacterium* species. **New Microbiologica**, v.39, n. 4, p. 259–263, 2016.

SHITIKOV, E., ILINA, E., CHERNOUSOVA, L., BOROVSKAYA, A., RUKIN, I. et al. Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p. 838–845, 2011.

SILVA, M. R., ROCHA, A. S., COSTA, R. R., ALENCAR, A.P., OLIVEIRA, V.M. et al. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.108, n.3, p.321–327, 2013.

TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, F., BALLY, F., BOTRGER, E. C. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal Clinical Microbiology**, v.31, p. 175–178, 1993.

WATTAL, C., OBEROI, J. K., GOEL, N., RAVEENDRAN, R., KHANNA, S. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, p. 807–812, 2017.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368-2000
Fax: (67) 3368-2150
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª edição (2020): eletrônica



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



GOVERNO FEDERAL

Comitê Local de Publicações da Embrapa Gado de Corte

Presidente

Lucimara Chiari

Secretário-Executivo

Rodrigo Carvalho Alva

Membros

*Alexandre Romeiro de Araújo, Davi José
Bungenstab, Fabiane Siqueira, Gilberto
Romeiro de Oliveira Menezes, Marcelo Castro
Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Marta
Pereira da Silva, Mateus Figueiredo Santos,
Vanessa Felipe de Souza*

Supervisão editorial

Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto

Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações

Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa

Newton Valério Verbick

*(Intensidade de dois m/z selecionados dos espectros de
massas de referência, que classificam os isolados de M.
bovis listados na Tabela 2 deste artigo)*